

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440153

研究課題名(和文) 比較分子形態学的手法による脊椎動物における肝臓構築の多様性と構築メカニズムの解明

研究課題名(英文) Comparative analyses of hepatic architectures of vertebrates with special attention paid to portal triad development

研究代表者

塩尻 信義 (Shiojiri, Nobuyoshi)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：70162568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の肝臓構築は、門脈と肝内胆管の走行関係から門脈並走型胆管または独立型胆管を有する、2タイプに分類できる。独立型胆管は条鰭類でみられ、門脈並走型胆管は哺乳類を含め他の脊椎動物の肝臓がもつ。条鰭類の多様化過程で、門脈並走型から独立型胆管への変化は起こり、特にカライワシ目の種では両者の中間型の構築をとった。哺乳類肝発生で胆管誘導を担うJag1のアミノ酸配列を比較解析し、胆管構築の多様性を考察した。

研究成果の概要(英文)：The hepatic architecture of vertebrates was classified into two types; portal triad-type with intrahepatic bile ducts running along portal veins, and non-portal triad-type with intrahepatic bile ducts independent of portal veins. The latter was observed in many actinopterygians, and the former was seen in other vertebrates, including agnathans, chondrichthyans and mammals. In a process of diversification of actinopterygians, the portal triad-type hepatic architecture gradually changed into the non-portal triad-type hepatic architecture. Fishes of Elopiformes had an intermediate hepatic architecture of both types. Amino acid sequences of Jag1, which is responsible for biliary induction in mammals, were comparatively analyzed among vertebrates with special attention paid to the hepatic architectures.

研究分野：組織構築学

キーワード：組織構築 多様性 胆管 肝前駆細胞 ノッチ 条鰭類 進化 脊椎動物

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の肝臓構築は、基本単位として六角柱状の肝小葉からなるが、門脈と肝内胆管の走行関係より門脈並走型胆管または独立型胆管を有する、大きく2タイプに分けることができる。独立型胆管は主に条鰭類の肝臓で認められ、門脈並走型胆管は哺乳類を含め他の脊椎動物の肝臓がもつ。門脈並走型から独立型への変化は条鰭類の進化・多様化過程でおこるとされるが、これが正確にいつ、どのような変遷をへておこるか、明らかではない。カエルの変態過程で、消化管や尾等は大きな形態変化を生ずるが、肝臓構築の変化に関してほとんど報告はない。カエル成体の肝臓は門脈並走型胆管を有するが、変態前には独立型胆管をもち、変態にともなって構築が変化する可能性がある。さらに、哺乳類の肝臓発生過程では、門脈間充織からの Jag1 シグナルが隣接する肝芽細胞に Notch2 受容体を介して作用し、胆管上皮細胞に分化することが知られるが、条鰭類の肝臓の胆管発生がどのような過程をへて、またどのようなしくみでおこるか、研究はほとんどなされていない。Jag1 タンパク質のアミノ酸配列そのものに脊椎動物の種間で多様性があり、これが肝臓構築の多様性に関係する可能性もある。

2. 研究の目的

本研究は、脊椎動物における肝臓構築の多様性とその構築原理を明らかにするとともに、その系統進化・適応における意義を探ることを目的としている。そのために、次の研究項目について解析を行った。

- (1) 脊椎動物における肝臓構築の多様性
- (2) アフリカツメガエルの変態にともなう肝臓構築の変化
- (3) 条鰭類ゼブラフィッシュ肝臓の発生
- (4) 胆管誘導因子 Jag1 のアミノ酸配列の比較解析

3. 研究の方法

材料として、ホヤ綱壁性目マボヤ、条鰭綱アミア目、アロワナ目、カライワシ目、ウナギ目、ニシン目、フグ目、肉鰭綱シーラカンス目、ケラトドゥス目(オーストラリアハイギョ肝臓は写真データのみ)、レピドシレン目等の動物の肝臓を用いた。アフリカツメガエル変態期の肝臓ならびにゼブラフィッシュ胚(受精後3~5日)を用いた。肝臓構築は組織学的に検索するとともに、サイトケラチンの免疫組織化学的解析を行い、胆管構造を特定した。肝臓内の微細構築を解析するために、透過型ならびに走査型電子顕微鏡による解析を行った。また、遺伝子発現解析として Jag1 を含む種々の肝特異的遺伝子について *in situ* hybridization ならびに RT-PCR 解析を行った。Jag1 のアミノ酸配列に関しては、web 上にあるデータベースからダウンロードして、比較配列解析を行った。

4. 研究成果

(1) 頭索類(ナメクジウオ;肝憩室の状態)から無顎類(ヌタウナギ;実質臓器としての肝臓構築をとり、門脈並走型胆管をもつ)にかけて肝臓構築は劇的な変化を示すので、その間に位置するマボヤの肝臓をまず入手し組織学的に解析した。マボヤ肝臓は、その上皮細胞が極めて複雑な袋状構造をとるが、一般に言う肝実質部が形成されることはなかった。この結果より、実質臓器としての肝臓は、無顎類から出現し、その肝臓は哺乳類の肝臓構築の原型であったといえる。

条鰭類の進化・多様化過程で門脈並走型胆管から独立型胆管への変化が正確にいつ、どのような変遷をへておこるか、調べるために、アミア目(アミア)、アロワナ目(アフリカナイフ、エレファントノーズ、ジムナーカス、スポットナイフ、シルバーアロワナ)、カライワシ目(アトランチックターポン、パシフィックターポン)、ウナギ目(ホタテウミヘビ、アミウツボ、マアナゴ、ニホンウナギ、アメリカウナギ、ピカラ)、ニシン目(ウルメイワシ、キビナゴ)、フグ目(クサフグ)等の肝臓構築を組織学ならびに免疫組織化学的に解析した。その結果、アミア目とアロワナ目肝臓は門脈並走型胆管であった。カライワシ目とウナギ目の肝臓は、門脈並走型胆管をもつが、肝実質部内に細胆管がよく発達し、独立型胆管をもつ部分もあった。ニシン目、フグ目の肝臓の胆管は独立型で、細胆管がよく発達した。これらの結果より、門脈並走型から独立型胆管への変化はカライワシ目とウナギ目でおこり始める可能性が高いと推察した。またこれらの動物の肝臓構築は門脈並走型胆管あるいは独立型胆管をもつ肝臓構築の中間型であり、条鰭類における肝臓構築の変化が漸次的におこることを示唆している。

肉鰭類アフリカハイギョ、ミナミアメリカハイギョ、オーストラリアハイギョ(写真提供のみ)、シーラカンス肝臓の組織構築について検討したところ、前3者は独立型胆管をもつことがわかった。他方、シーラカンス肝臓は、用いたサンプルの保存が悪い状況ではあったが、門脈並走型胆管を有すると判断できた。両生類に最も近縁であるとされるハイギョ類の肝臓構築がなぜ門脈並走型胆管をもたず、独立型胆管をもつのか大変興味深い。今のところ理由は明らかではない。条鰭類の多くの種と肉鰭類の一部の種で独立型胆管をもつ肝臓が出現した事実から、これらの肝臓構築の違いは生物適応の面から意義がある可能性があると思われる。

次に、種々の動物群で肝内の細胆管構造の発達、肝内胆管の分布様式とどのような関係にあるか、透過型ならびに走査型電子顕微鏡を用いて解析した。細胆管上皮細胞は免疫組織化学的にはサイトケラチン強陽性であるが、透過電顕レベルでも、基底膜をもつ細胆管細胞から構成されることがわかった。あ

わせて門脈並走型胆管をもつ場合、あまり細胆管構造は肝内に発達しないが、独立型胆管をもつ場合は細胆管構造が発達することを確認した。これらの結果より、門脈並走型胆管ならびに独立型胆管をもつ種で胆汁を分泌するしくみに違いがある可能性が高いことが推察された。また独立型胆管をもつ種の肝臓の類洞構造は穴開き型内皮から構成されており、これについては脊椎動物全体で共通性がある。

(2) アフリカツメガエルの変態過程で、胆管分布を含め肝臓構築の再編がおこるか、特にハイギョ類の独立型胆管から哺乳類の門脈並走型胆管への転換に相当するような変化がおこるか注目して組織学および免疫組織化学的に解析した。その結果、変態前には肝臓内にあまり胆管が発達することはなかったが、変態の進行にともない肝内胆管は門脈に沿って分布した。この変化は、マウス肝臓の組織形成過程でおこる胆管形成に類似しており、その意味でも変態前後で胆管分布パターンが大きく変わることはないといえる。また哺乳類肝発生における胆管誘導因子である *jag1* の発現を *in situ* hybridization 法を用いて変態過程で解析したところ、門脈内皮と間充織で発現が認められ、両生類の場合も、門脈間充織からの *jag1* シグナルが隣接する肝細胞に作用し、胆管分化がおこると考えられた。

(3) ゼブラフィッシュ肝臓の発生（受精後 3~5 日まで）を、組織学ならびに、サイトケラチン抗体を用いて免疫組織化学的に調べたところ、従来の報告とは異なり、これらの時期の肝臓内にサイトケラチン陽性の肝内胆管が発達することはなかった。肝外胆管は認められた。肝内には肝細胞と類洞構造が観察された。独立型胆管をもつゼブラフィッシュ成体肝臓で、哺乳類における胆管シグナルである Jag1-Notch2 シグナルに相当する *Jag1a* と *Notch2* の発現解析を *in situ* hybridization 法を用いて行った。その結果、これらのシグナルは肝外胆管上皮には認められたが、肝内胆管では発現が確認できなかった。今後さらに条件検討を行う必要がある。

(4) 哺乳類胆管発生において、門脈間充織からの誘導因子である Jag1 タンパク質について、そのアミノ酸配列をデータベースから入手し、ヒト、マウス、ニワトリ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、メダカで比較した。独立型胆管をもつゼブラフィッシュ、メダカでは、パラログ *jagged1a*、*jagged1b* が登録されていた。そこで、上記 6 種の Jag1 タンパク質と 2 種の Jag1 パラログの全アミノ酸配列についてそれぞれの相同性を比較したところ、55~95%と差があった。Jag1 タンパク質の細胞外領域を構成する EGF 様ドメイン (Epidermal growth factor-like domain) は受容体との結合の安定化に寄与するものであるが、その繰り返し数などに種間で差があ

った。しかし、リガンドとして受容体との結合に重要な最小単位である DSL (delta serrate ligand) 領域での配列は保存性が高く、また配列に多少差はあるものの他の構成ドメインの種類や数にも差はなかった。そのため、これらの種間で Jag1 タンパク質はパラログもふくめ機能面ではある程度保存性があると考えられた。

データベース上で情報を入手できる脊椎動物（ヒト、マウス、ニワトリ、ガーターヘビ、ネッタイツメガエル、シーラカンス、ドウクツギョ、ニシン、ゼブラフィッシュ、メダカ、ノーザンパイク、タイセイヨウサケ、セイルフィン・モーリー、プラティフィッシュ、フグ等）の Jag1 オルソログのアミノ酸配列をパラログのそれをふくめ、MEGA 6 ソフトウェアを用い最尤法により系統樹を作成した。外群としてショウジョウバエ *Serrate* の配列を用いた。その結果、系統樹は、形態あるいは他の分子を用いて作成された系統樹と矛盾しない形で作成でき、またこの系統樹は胆管構築の変化とよく一致していた。*jagged1a* と *jagged1b* のパラログは真骨区の共通祖先でおこった全ゲノム重複に起因するものである可能性が高く、またその重複が胆管走行を変化させたかもしれない。タンパク質レベルで機能がよく保存されているとすると、重複による発現量の増加や発現場所の変化が胆管走行の変化に関わった可能性がある。今後は受容体の配列解析さらには遺伝子発現の時空間的制御を担う上流制御領域の比較解析も必要となる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Fukuda, T., Fukuchi, T., Yagi, S. and Shiojiri, N. (2016) Immunohistochemical analyses of cell cycle progression and gene expression of biliary epithelial cells during liver regeneration after partial hepatectomy of the mouse. *Exp. Anim.*, 65, 135-146. 査読有 [https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/65/2/65_15-0082/_article]

Ueno, T., Ishihara, A., Yagi, S., Koike, T., Yamauchi, K. and Shiojiri, N. (2015) Histochemical analyses on biliary development during metamorphosis of *Xenopus laevis* tadpoles. *Zool. Sci.*, 32, 88-96. 査読有 [doi: http://dx.doi.org/10.2108/zs140104]

塩尻信義(2015) 胆管発生. *肝胆臓*, 70(3), 385-393. 査読無

Akai, Y., Oitate, T., Koike, T. and Shiojiri, N. (2014) Impaired hepatocyte maturation, abnormal expression of biliary transcription factors and liver fibrosis in C/EBPα (*Cebpa*)-knockout mice. *Histol. Histopathol.*, 29, 107-125. 査読有 [DOI:

10.14670/HH-29.107]

[学会発表](計 11 件)

塩尻信義・太田考陽・福地智一・安保友香・関口純理・松原幸枝・川上速人(2016) 条鰭類における肝臓構築の多様化はカライワシ目を起点におこる 第 23 回肝細胞研究会(大阪大学中之島センター・大阪市) 7 月 7-8 日

塩尻信義(2015) 胆管発生と肝特異的転写因子 C/EBP α 第 42 回日本小児栄養消化器肝臓学会(広島国際会議場・広島市) シンポジウム 1 『胆道閉鎖症の病因は?』 10 月 17 日

塩尻信義・亀谷治頌・福地智一・安保友香・関口純理・松原幸枝・川上速人(2015) 条鰭類における肝臓構築の多様性 日本動物学会第 86 回大会(朱鷺メッセ・新潟市) 9 月 17-19 日

塩尻信義・川上速人(2015) 肉鰭類シーラカンスの肝臓の組織構築 第 22 回肝細胞研究会(米子コンベンションセンター・米子市) 6 月 4-5 日

塩尻信義(2014) 条鰭類、肉鰭類における肝臓構築の多様性 第 21 回日本肝臓医生物学研究会(天神の湯・静岡市) 10 月 4 日

八木志乃海・小池亨・塩尻信義(2014) *in vitro* におけるマウス胎生期臓側卵黄嚢の壁側卵黄嚢への分化転換 日本動物学会第 85 回大会(東北大学川内北キャンパス・仙台市) 9 月 11-13 日

上野友也・福地智一・鈴木淳史・山本太一・野口民夫・小池亨・塩尻信義(2014) 肝臓特異的 *Hhex* 遺伝子欠失マウス肝臓における嚢胞発生と Wnt シグナル 第 21 回肝細胞研究会(東京医科歯科大学 M&D タワー 2 階 鈴木章夫記念講堂・東京都文京区) 6 月 27-28 日

塩尻信義(2013) 「下等脊椎動物における肝臓構築」第 19 回日本肝臓医生物学研究会(北海道大学札幌キャンパス・札幌) 11 月 30 日

八木志乃海・小池亨・塩尻信義(2013) マウス胎生期卵黄嚢の分化多能性に関する解析 日本動物学会第 84 回大会(岡山大学津島キャンパス・岡山市) 9 月 26-28 日

Nobuyoshi Shiojiri, Toru Koike, Takeshi Oitate, Yusuke Akai (2013) Impaired hepatocyte maturation through inactivation of the C/EBP α gene induces not only abnormal expression of biliary transcription factors but also liver fibrosis 第 20 回肝細胞研究会(大阪国際会議場・大阪市) 9 月 26-27 日 The 20th Annual Meeting of the Japanese Society of the Research of Hepatic Cells, Sept 26-27, 2013, Osaka (Osaka International Convention Center)

Tomoya Ueno, Taichi Yamamoto, Tamio Noguchi, Toru Koike, Nobuyoshi Shiojiri (2013) Hepatic cyst formation and abnormal

bile duct development in liver-specific *Hhex* knockout mice 第 20 回肝細胞研究会(大阪国際会議場・大阪市) 9 月 26-27 日 The 20th Annual Meeting of the Japanese Society of the Research of Hepatic Cells, Sept 26-27, 2013, Osaka (Osaka International Convention Center)

[図書](計 1 件)

Sugiyama, Y., Tomiya, T., Akai, Y., Hattori, S., Koike, T. and Shiojiri, N. (2014) Immunolocalization of syntaxin2 (epimorphin) in sinusoidal endothelial cells in adult and developing mouse livers. In: *Fetal Development: Stages of Growth, Maternal Influences and Potential Complications* (Ed. Josiah Wilburn), pp181-204 (Chapter 5), New York, Nova Science Publishers, Inc.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://liverlovers95.wix.com/shiojiri-koike-lab>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩尻 信義 (SHIOJIRI NOBUYOSHI)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号: 70162568